



PATENT  
2185-0208P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Tomokazu KOSHIBA  
Serial No.: 08/943,144  
Filed: October 3, 1997  
For: ALDEHYDE OXIDASE GENE DERIVED FROM PLANT AND UTILIZATION THEREOF  
Group: Unassigned  
Examiner: Unassigned

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

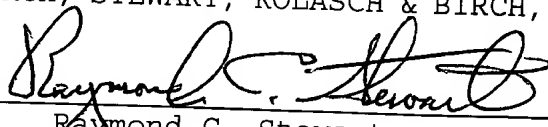
<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
Japan	8-283314	October 4, 1996

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

Please charge any fees under 37 C.F.R. § 1.16-1.21(h) or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By   
Raymond C. Stewart  
Reg. No. 21,066

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

RCS:kdm  
Attachment  
(Rev. 06-16-97)



本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

5208/943, 144  
October 3, 1997  
Birch, Keweenaw,  
Keweenaw Birch, WP  
(703) 235-9000  
2185-20812

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 6 年 1 0 月 4 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8 年特許願第 2 8 3 3 1 4 号

出 願 人

Applicant (s):

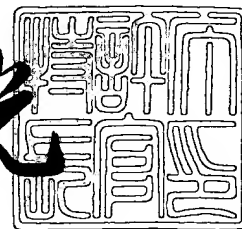
小 柴 共 一

1 9 9 7 年 1 0 月 2 4 日

特 許 庁 長 官

Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平 0 9 - 3 0 8 5 7 2 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 P191053

【提出日】 平成 8年10月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 植物由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子及びその利用

【請求項の数】 16

【発明者】  
     【住所又は居所】 東京都八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学理学  
                                 部生物学科内  
     【氏名】 小柴 共一

【特許出願人】  
     【郵便番号】 192-03  
     【住所又は居所】 東京都八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学理学  
                                 部生物学科内  
     【氏名又は名称】 小柴 共一

【提出物件の目録】  
     【物件名】 明細書 1  
     【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物から得られうる約4.4 k b pの遺伝子であり、アルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項2】

アルデヒド化合物がインドールアセトアルデヒドであり、カルボン酸がインドール酢酸であることを特徴とする請求項1記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項3】

トウモロコシ (Zea mays L.) 植物由来の請求項1又は2記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項4】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列であることを特徴とする請求項1記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項5】

配列番号2で示される塩基配列 (CDS の存在位置 46..4120) を有することを特徴とする請求項4記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項6】

配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列であることを特徴とする請求項1記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項7】

配列番号4で示される塩基配列 (CDS の存在位置 91..4138) を有することを特徴とする請求6項記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。

【請求項8】

請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子を含むことを特徴とするプラスミド。

【請求項 9】

請求項 8 記載のプラスミドを宿主細胞内に導入することにより形質転換させた形質転換体。

【請求項 10】

宿主細胞が微生物であることを特徴とする請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 11】

宿主細胞が植物であることを特徴とする請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 12】

(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることを特徴とする発現プラスミドの構築方法。

【請求項 13】

(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミド。

【請求項 14】

(1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) アルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び(3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミドを宿主細胞内に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体内でのアルデヒドオキシダーゼ産生を制御する方法。

【請求項 15】

アルデヒドオキシダーゼ遺伝子が植物由来であり、かつ宿主細胞が植物であることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

発現プラスミドが請求項 13 記載の発現プラスミドであることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、植物由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子等及びその利用に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

高等植物は一般に、種子発芽、栄養生長、生殖生長、受精、種子形成という生活環を有しており、その各々の発生ステージは種々の植物生長ホルモンの生理作用によってコントロールされている。高等植物が天然に持つ植物生長ホルモンとして、代表的なものに、一般にオーキシン類として分類されるインドール酢酸 (IAA: indole-3-acetic acid)、サイトカイニン類として分類されるゼアチン (zeatin) またはカイネチン (kinetin)、さらに、ジベレリン (gibberellin)、アブシジン酸 (ABA: abscisic acid)、エチレン (ethylene) などが知られている。これらの植物生長ホルモンの生理作用の概要は既に明らかにされており、その生理作用に対する理解から、様々な農業生産への応用がはかられてきた。

【0003】

例えば、ジベレリンは果実の肥大成長を促進し、受精していない場合にも単為結果をひきおこす。この現象は、トマト、キュウリ、ブドウなど多種の作物で知られているが、特にブドウへの処理によるタネナシブドウの育成は、実用的に大きな成功をおさめた植物生長ホルモンの応用例として挙げられる。また、ジベレリンの生理作用を阻害する薬剤の応用も進められており、例えば、ジベレリン合成阻害剤であるユニコナゾールなどが矮化剤として利用されている。

【0004】

また、オーキシン類は一般に細胞の伸長生長を促進する作用が知られている。例えばキクの葉刺し栽培では、発根促進剤として、合成オーキシンであるインドール酢酸 (IBA) が葉柄の切断部に処理される。また、トマトのハウス栽培では着果促進剤として 4-クロロフェノキシ酢酸処理が行われている。

【0005】

さらに、植物細胞・組織を無菌的な状態で人工栄養を与えて育てる植物組織培養の技術でも、植物生長ホルモンの果たす役割は非常に大きい。ここでも、細胞の分裂・生長・分化を促進するために、様々な種類の植物生長ホルモンが多様な濃度で培地に添加される。特に合成サイトカイニンとしてベンジルアミノプリン (BA)、イソペンテニルアミノプリン (2iP) などが、また合成オーキシシンとしてナフタレン酢酸 (NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) などが広く使用されている。

## 【0006】

近年の生化学・分子生物学的実験手法の発達により、植物生長ホルモン類の生合成・代謝経路、分子レベルでの作用機作に関する研究に大きな進展が見られるようになった。例えば、エチレンの生合成経路についての詳細が明らかにされつつあり、実用的な応用もはかられようとしている。即ち、エチレン生合成経路の重要な鍵酵素である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (ACC synthase) の遺伝子がクローニングされ、このアンチセンス遺伝子がトマトに導入された。形質転換トマトでは ACC 合成酵素遺伝子の転写・翻訳が抑制されてエチレン生合成がブロックされることにより、果実の過熟が抑えられて日持ちのする品種が作られている。

## 【0007】

このような例からも、植物生長ホルモンの生合成経路、これに係わる代謝酵素およびその遺伝子を明らかにすることは、農業生産上非常に重要な課題である。

## 【0008】

植物生長ホルモンの中でも、天然オーキシシンであるインドール酢酸 (IAA) は最も早く発見され、多くの研究が重ねられてきた。こうした研究から、IAA はアミノ酸の一種トリプトファンが初発の前駆物質となり生合成されと考えられている。しかしながら、その生合成経路に係わる酵素遺伝子群についてはまだ明らかにされていない。

## 【0009】

土壌病原細菌である Agrobacterium tumefaciens は Ti-プラスミド上にふたつの酵素タンパク質遺伝子を持ち、トリプトファンからインドール酢酸を合成し

て宿主植物細胞の細胞分裂を促進し、根頭癌腫病（クラウンゴール）をひきおこす。即ち、トリプトファンを酸化してインドールアセトアミド（indoleacetamide）に変換するトリプトファンモノオキシゲナーゼ（tryptophan 2-monooxygenase）酵素タンパク質遺伝子（*iaaM*）、及び、インドールアセトアミドを加水分解して IAA に変換するインドールアセトアミドヒドラーゼ（indoleacetamide hydrolase）酵素タンパク質遺伝子（*iaaH*）であり、これらの遺伝子は既にクローニングされている。また、他種バクテリアである *Pseudomonas syringae* でも同様の知見が得られている。

#### 【0010】

ところが、高等植物においては、別経路の生合成が行われていると考えられている。即ち、トリプトファンから酸化反応によりインドールアセトアミドが作られるのではなく、ある種のトランスアミナーゼ酵素によりインドールピルビン酸が作られ、さらにある種の脱炭酸酵素によりインドールアセトアルデヒドとなり、最後にこれが酸化されて IAA となる。こうした高等植物での IAA 生合成酵素については、その酵素タンパク質、遺伝子に関してこれまで何ら知られていなかった。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

前述のように、IAA は高等植物が自身で合成する天然の植物生長ホルモン：オーキシンであり、その生理活性により植物の様々な形態形成や環境適応を精密に制御している。従って、その生合成経路を解明して人為的にコントロールする手段を作り出すことは、基礎的生物学分野のみならず、産業上、特に農業生産上極めて重要である。即ち、植物の IAA 生合成・生理活性発現作用を自在に変更することが可能となれば、作物栽培全般における生長促進による早生化、苗生産における発根促進による歩留まり向上・高品質化、果菜類栽培における果実の肥大促進による増収、鑑賞植物育成における開花促進による高付加価値化や落葉・老化防止による延命などを実現することができる。このため、植物の IAA 生合成経路の解明、植物の育種に適する IAA 生合成酵素タンパク質遺伝子の探索が強く望まれている。



## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者は鋭意検討した結果、トウモロコシから IAA 生合成の最終段階を触媒するアルデヒドオキシダーゼを精製することに成功し、その部分アミノ酸配列を解明するとともに、cDNA 遺伝子をクローニングして塩基配列を解明し、酵素の全アミノ酸配列を解明し、本発明に至った。

## 【0013】

即ち、本発明は、

- 1) 植物から得られうる約 4.4 kbp の遺伝子であり、アルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す）。
- 2) アルデヒド化合物がインドールアセトアルデヒドであり、カルボン酸がインドール酢酸であることを特徴とする前項 1 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 3) トウモロコシ (Zea mays L.) 植物由来の前項 1 又は 2 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 4) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列であることを特徴とする前項 1 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 5) 配列番号 2 で示される塩基配列 (CDS の存在位置 46..4120) を有することを特徴とする前項 4 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 6) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列であることを特徴とする前項 1 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 7) 配列番号 4 で示される塩基配列 (CDS の存在位置 91..4138) を有することを特徴とする前項 6 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子。
- 8) 前項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子を含有することを特徴とするプラスミド。
- 9) 前項 8 記載のプラスミドを宿主細胞内に導入することにより形質転換させた形質転換体。
- 10) 宿主細胞が微生物であることを特徴とする前項 9 記載の形質転換体。

1 1) 宿主細胞が植物であることを特徴とする前項 9 記載の形質転換体。

1 2) (1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 前項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び (3) 植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることを特徴とする発現プラスミドの構築方法。

1 3) (1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 前項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び (3) 植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミド。

1 4) (1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) アルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び (3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミドを宿主細胞内に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体内でのアルデヒドオキシダーゼ産生を制御する方法。

1 5) アルデヒドオキシダーゼ遺伝子が植物由来であり、かつ宿主細胞が植物であることを特徴とする前項 1 4 記載の方法。

1 6) 発現プラスミドが前項 1 3 記載の発現プラスミドであることを特徴とする前項 1 4 記載の方法。

を提供するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0015】

本発明遺伝子は、植物から得られうる約 4.4 kbp の遺伝子であり、アルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子である。例えば、インドールアセトアルデヒドを酸化してインドール酢酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子である。本発明遺伝子は、例えば、トウモロコシ (*Zea mays* L.) 等の植物から

得ることができる。本発明遺伝子の翻訳産物である酵素は、細胞内でアセトアルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する作用を持つ。該酵素は、インドールアセトアルデヒドの他に、例えば、ベンズアルデヒド (benzaldehyde)、ブチルアルデヒド (butyraldehyde)、プロトカテキユアルデヒド (protocatechualdehyde) 等も基質とすることもある。もちろん、単一の酵素であっても、複数の化合物を基質とすることもある。

## 【0016】

本発明遺伝子として、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を持つ遺伝子が具体的にあげられ、これらの同効物も含まれる。ここで「...の同効物」とは、配列番号1または配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子において、ひとつもしくは複数の塩基が付加、欠失または置換した塩基配列からなるアルデヒドオキシダーゼ遺伝子を意味し、同一の機能を有する類似体である DNA のことである。さらに具体的には、例えば、配列番号2で示される塩基配列 (CDSの存在位置46..4120)、または、配列番号4で示される塩基配列 (CDSの存在位置91..4138) を有する遺伝子が挙げられる。

## 【0017】

本発明遺伝子は、例えば、下記の方法により得ることができる。

## 【0018】

例えば、トウモロコシ品種ゴールデングロスバンタム70 (サカタの種より購入) の種子を、水道水流水中に一晚浸漬して催芽処理を行った後、水を含んだペーパータオルの上に播種し、25℃の条件下、赤色光 ( $0.8 \text{ W/m}^2$ ) 下で2日間、さらに暗所で1日間置き、種子を発芽させる。発芽した芽生えより 1.0~1.5 cm に達した幼葉鞘の先端部を緑色安全光下で切り出し、液体窒素で直ちに凍結して、酵素精製のための試料、及び、RNA 抽出のための試料として -30℃ で保存する。

## 【0019】

こうして調製された凍結試料からアルデヒドオキシダーゼを精製するには、例

えば、Koshiba, T. ら著、Plant Physiology、1996 年、110 巻、781-789 頁に述べられている方法が適している。

#### 【0020】

即ち、抽出精製中の酵素の活性低下・タンパク質の分解を防ぐために、こうした操作での常法として、精製ステップのすべての操作は 2~4 °C の低温下で行うのが望ましい。まず、凍結試料 150~200 g を 1 回分の精製操作の材料とし、これに 400 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてホモジナイザー等により機械的に破碎し、12,000 g で 30 分間遠心した上清を採取して粗酵素標品とする。次に、該粗酵素標品より 30~50 % 飽和硫酸の画分を得て、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で透析後、20,000 g で 20 分間遠心を行う。この遠心上清をイオン交換カラム (例えば、DEAE トヨパール 650M、東ソー社製) に通し、アルデヒドオキシダーゼ活性画分を回収する。さらに、該活性画分を順次、疎水カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、イオン交換カラム (例えば、DEAE-5PW) によるクロマトグラフィーにかけ、アルデヒドオキシダーゼ活性を持つ画分が電気泳動で銀染色によりほぼ単一のタンパク質バンドとして検出されるまで精製を行う。

#### 【0021】

以上の精製操作によって、通常、粗酵素標品の段階でのタンパク質量から換算して、アルデヒドオキシダーゼ比活性にして約 2,000 倍の精製が可能である。最終の精製タンパク質は、ゲルろ過カラムにより分子量約 300 kD の大きさであることが確認できる。さらに、SDS-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分子量約 150 kD のサイズのバンドとして検出することができ、該酵素が 2 量体を形成していることが確認できる。

#### 【0022】

上記のカラムクロマトグラフィーの分画操作において、アルデヒドオキシダーゼ活性画分を効率的に採取するには、各画分のアルデヒドオキシダーゼ活性を測定することにより達成される。これには、例えば、インドールアセトアルデヒドを基質として精製画分に添加し、生成されてくるインドール酢酸の量を HPLC により定量する方法を採ることができる。即ち、反応液として、5~50  $\mu$ l の精製

画分、0.1 mM インドールアセトアルデヒド、0.1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、を含む溶液 100  $\mu$ l を調製する。これを 30  $^{\circ}$ C で 30 分間保温して反応を進め、直ちに 1N 塩酸 8  $\mu$ l、2.0 M 亜硫酸水素ナトリウム 5  $\mu$ l、メタノール 50  $\mu$ l を順次反応液に加え反応を停止させる。この反応液を 15,000 g で 5 分間の遠心を行い、得られた上清 100  $\mu$ l を HPLC による分析試料とし、280nm 吸光度を検出することにより基質であるインドールアセトアルデヒド及び反応性生物であるインドール酢酸の定量を行うことが可能である。HPLC は、例えば、ODS C18 カラムを用い、0.1 % 酢酸を含むメタノールの 20~50 % の直線的勾配で溶出させる方法が有効である。

#### 【0023】

このようにして得られたタンパク質を部分分解してその分解ペプチドを解析し、部分アミノ酸配列情報を得る。通常、精製したアルデヒドオキシダーゼ試料を SDS-PAGE により分離し、150 kD のタンパク質バンドを切り出して回収する。回収したゲル断片を、例えば、0.1 % SDS 存在下で *Achromobacter* Protease I (API) と反応させ、消化されたペプチド断片を抽出する。これを、例えば、陰イオン交換体 (DEAE) のプレカラムを付けた逆相 HPLC によりペプチドを分離、回収する。これらのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにより決定するとともに、その試料の一部を用いて MALDI-TOF で分子量を測定し、得られたアミノ酸配列情報の正確さを検定する。

#### 【0024】

次に、得られたアミノ酸配列情報をもとに、このアミノ酸配列をコードすると予測される oligo DNA を合成する。さらに全 RNA を鋳型とする RT-PCR を行い、cDNA 部分断片を増幅してプラスミドベクターにクローニングする。

#### 【0025】

全 RNA の抽出には、例えば、凍結試料 7 g を液体窒素 10 ml 中で乳鉢・乳棒により磨砕し、細かい粉末状にする。液体窒素を気化させた後、常法、例えば、グアニジンチオシアネート / 塩化セシウム法を用いて RNA 抽出を行い、この抽出液からエタノール沈澱により全 RNA を回収する。この操作により、通常、1 mg の全 RNA が得られる。

## 【0026】

cDNA 増幅には、まず、合成 oligo DNA のうち antisense 方向に合成したものをプライマーとして、全RNA 中の目的遺伝子の転写物に結合させて逆転写反応を行う。逆転写反応には、市販の逆転写 PCR キット、例えば、RNA-PCR キット (Perkin-Elmer Cetus Instruments 社製) を用いることができる。次に、得られた逆転写産物に sense 方向に合成した oligo DNA を加えて再度 PCR を行うことにより、cDNA 断片を増幅することができる。

## 【0027】

得られた cDNA 増幅断片を精製し、プラスミドベクターにクローニングする。プラスミドベクターとしては、例えば pCRII (Invitrogen 社製) を使用することが可能であり、通常の方法により大腸菌を形質転換して、インサートを持つ形質転換体をスクリーニングすることにより、cDNA 増幅断片をクローン化することができる。得られた cDNA クローンについて、例えば、ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems 社製) を用いて、373A DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製) により、該クロンの塩基配列を決定する。

## 【0028】

このようにして得られた cDNA 部分断片の塩基配列の一部分に対するセンス、アンチセンスプライマーを合成し、RACE 法を行うことにより、5'-方向、及び、3'-方向のそれぞれ末端を含む cDNA 断片を得ることができる。さらにこれらを連結して、プラスミドベクターにクローニングすることにより、完全長 cDNA を得ることができる。RACE 法には、例えば、市販の Marathon cDNA Amplification kit (Clontech 社製) を用いることが可能である。

## 【0029】

本発明遺伝子は、例えば、下記のように利用することができる。

## 【0030】

例えば、本発明遺伝子を、微生物、植物等の宿主細胞内に導入して形質転換させた形質転換体を作成する。

## 【0031】

本発明遺伝子を植物細胞内に導入して発現させるためには、(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)本発明遺伝子(段落番号13における第1項ないし第7項に記載されるアルデヒドオキシダーゼ遺伝子)、及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミドを構築し、構築された発現プラスミドを植物細胞内に導入し、該植物細胞を形質転換させる。

ここで「機能可能な形で」とは、構築されたプラスミドを植物細胞内に導入し形質転換させた場合に、該植物細胞内において導入された本発明遺伝子が正常に転写・翻訳され、前記植物細胞内でタンパク質を発現させる機能を有するように、プロモーターの制御下に目的とする遺伝子を組み込んだ状態になることを意味するものである。

植物細胞内で機能可能なプロモーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)プロモーター等のT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19S及び35Sプロモーター等の植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子プロモーター、pathogen-related(PR)遺伝子プロモーター等の誘導型プロモーター等をあげることができる。さらにこれらに限定されない公知の植物プロモーターもあげられる。

また、植物細胞内で機能可能なターミネーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーター等のT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンニクウイルスGV1, GV2のターミネーター等の植物ウイルス由来のターミネーター等をあげることができる。さらにこれらに限定されない公知の植物ターミネーターもあげられる。

このようなプラスミドを植物細胞内に導入することにより該植物細胞を形質転換するには、例えば、上記発現プラスミドをアグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917及び特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887及び特開平5-68575)、又はパーティクルガン方法(特表平5-508316及び特開昭63-258525)等の公知の手段により植物細胞内に導入

し、本発明遺伝子が導入された植物細胞を選抜することによって形質転換植物細胞を得ることができる。得られた形質転換植物細胞から、例えば、内宮著、植物遺伝子操作マニュアル（トランスジェニック植物の作り方）1990年、講談社サイエンティフィク（ISBN4-06-153515-7 C3045）、27-55 頁等に記載の通常の植物細胞培養方法により植物体を再生することによって形質転換された植物体を得る。

### 【0032】

さらに本発明は、（１）宿主細胞内で機能可能なプロモーター、（２）アルデヒドオキシダーゼ遺伝子、及び（３）宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミドを宿主細胞内に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体内でのアルデヒドオキシダーゼ産生を制御する方法をも提供する。

宿主細胞内で機能可能なプロモーターとしては、例えば、大腸菌のラクトースオペロンのlacZ遺伝子プロモーター、酵母のアルコール脱水素酵素遺伝子（ADH）プロモーター、アデノバイラス・メジャーレート（Ad.ML）プロモーター、SV40の初期プロモーター及びBaculo virus プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が植物である場合には、前述の如きの植物細胞内で機能可能なプロモーター等があげられる。

また、宿主細胞内で機能可能なターミネーターとしては、例えば、酵母のHIS terminator sequence、ADH1ターミネーター、SV40のearly splicing resion等をあげることができる。宿主細胞が植物である場合には、前述の如きの植物細胞内で機能可能なターミネーター等があげられる。

アルデヒドオキシダーゼ遺伝子としては、アルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子であればよい。例えば、植物由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子をあげることができ、好ましくは本発明遺伝子（段落番号13における第1項ないし第7項に記載されるアルデヒドオキシダーゼ遺伝子）をあげることができる。

このようなプラスミドを宿主細胞内に導入することにより該宿主細胞を形質転換するには、遺伝子工学分野において通常用いられる方法を使用すればよい。



## 【0033】

宿主細胞が植物の場合には、例えば、前記の如きの植物遺伝子工学分野及び植物組織培養分野において通常用いられる方法を使用すればよい。

## 【0034】

本発明遺伝子を導入して形質転換された植物体の生育特性として、一般に理解されているオーキシンの生理作用が促進されるもの、逆に抑制されるものの両面が期待できる。即ち、例えば、センスな遺伝子の働きでオーキシン活性を高めることにより、宿主細胞の伸長生長や維管束分化を促進して、植物の生長促進や光合成による同化産物の高蓄積能力を計ることが可能となる。その結果、作物の早生化、果実などの収穫物の大型化、収量性の向上又は高品質化等を期待できる。実現できる。逆に、アンチセンスな遺伝子の働きでオーキシン活性を抑制することにより、植物の徒長を防ぎ、日長不足など不適な環境条件下でも生育可能な作物を育成することができる。また、適度な生育抑制をかけることにより、作物の矮化が可能となり、例えば、イネ等の倒伏防止、切り花栽培での小型化などの応用が可能となる。その結果、収量性の向上又は高品質化等を期待できる。

## 【0035】

一般に植物の細胞・組織を無菌的に培養するには、培地へのホルモンの添加が必須である。本発明遺伝子を導入・発現させ形質転換体内でのアルデヒドオキシダーゼ産生を高めることによりオーキシン活性を向上させた植物は、無菌培養での細胞増殖・分化・個体再生能力が高められた状態であることが期待できる。従って、いわゆる培養のしやすい系統を作り出すことが可能であり、組織培養ベースで大量増殖が行われているウィルスフリー作物、花卉などの園芸作物の苗生産などに有用である。

## 【0036】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではない。

## 【0037】

実施例1 (トウモロコシ幼葉鞘の調製)

トウモロコシ品種ゴールドデックロスバンタム70（サカタの種より購入）を、水道水流水中に一晚浸漬して催芽処理を行った後、水を含んだペーパータオルの上に播種し、25℃の条件下、赤色光（ $0.8 \text{ W/m}^2$ ）下で2日間、さらに暗所で1日間発芽させた。発芽芽生えより2～3 cmに達した幼葉鞘の先端部（1.0～1.5 cm）を緑色安全光下で切り出し、液体窒素で直ちに凍結して-30℃で保存した。

#### 【0038】

#### 実施例2（アルデヒドオキシダーゼの精製）

以下の精製ステップのすべての操作は、2～4℃の低温下で行った。

#### 【0039】

まず、実施例1で調製した凍結試料約200 gを1回分の精製操作の材料とし、これに400 mlの0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えてホモジナイザーにより機械的に破碎した後、12,000 gで30分間遠心した上清を採取して粗酵素標品とした。次に、該粗酵素標品より30～50%飽和硫酸の画分を得て、20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で透析後、20,000 gで20分間遠心した。遠心上清をイオン交換カラム（DEAE トヨパール 650M、東ソー社製）に通し、後述の実施例3に記載された活性測定法により、アルデヒドオキシダーゼ活性画分を回収した。さらに、該活性画分を順次、疎水カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、イオン交換カラム（DEAE-5PW）によるクロマトグラフィーにかけ、アルデヒドオキシダーゼ活性を持つ画分が電気泳動で銀染色によりほぼ単一のタンパク質バンドとして検出されるまで精製を行った。

#### 【0040】

以上の精製操作によって、粗酵素標品の段階でのタンパク質量1,873 mgからイオン交換カラム画分で0.09 mgのタンパク質が回収され、この間のアルデヒドオキシダーゼ酵素比活性は1,950倍であった。最終の精製タンパク質は、ゲルろ過カラムにより、分子量約300 kDの大きさであることが判明した。さらに、SDS-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）では分子量約150 kDのサイズのバンドとして検出されたことから、2量体を形成していることが明らかとなった。

## 【0041】

## 実施例3 (アルデヒドオキシダーゼ活性の測定方法)

実施例2に記載された各精製画分のアルデヒドオキシダーゼ活性の測定は、インドールアセトアルデヒドを基質として精製画分に添加し、生成されてくるインドール酢酸 (IAA) の量を HPLC により定量する方法で行った。反応液は、5~50  $\mu$ l の精製画分、0.1 mM インドールアセトアルデヒド、0.1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、を含む反応液 100  $\mu$ l を調製して 30  $^{\circ}$ C で 30 分間の反応を行い、直ちに 1N 塩酸 8  $\mu$ l、2.0 M 亜硫酸水素ナトリウム 5  $\mu$ l、メタノール 50  $\mu$ l を順次反応液に加え反応を停止させた。この反応液を 15,000 g で5分間の遠心し、得られた上清 100  $\mu$ l を HPLC による分析試料とし、280nm 吸光度を検出することによりインドールアセトアルデヒド及びインドール酢酸の定量を行った。HPLC は、ODS C18 カラムを用い、0.1 % 酢酸を含むメタノールの 20~50 % の直線的勾配で溶出させる方法を採用した。

## 【0042】

## 実施例4 (アルデヒドオキシダーゼのペプチド分解・部分アミノ酸シーケンス)

実施例2で得られた精製タンパク質を SDS-PAGE により分離し、150 kD のタンパク質バンドを切り出して回収した。回収したゲル断片を 0.1 % SDS 存在下で *Achromobacter* Protease I (API) と反応させた。消化されたペプチド断片を抽出後、陰イオン交換体 (DEAE) のプレカラムを付けた逆相 HPLC によりペプチドを分離、回収した。それらのアミノ酸配列をプロテインシーケンサー (ABI 477A) により決定した。

## 【0043】

その結果、部分アミノ酸配列として以下の4種が確認された。即ち、

第1は、以下に示す 18 アミノ酸残基からなる配列であり、

Gln Val Asn Asp Val Pro Ile Ala Ala Ser Gly Asp Gly Trp Tyr His Pro Lys  
配列番号1に示すアミノ酸配列の第235番目から第252番目までに相当することが判明した。

## 【0044】

第2は、以下に示す 16 アミノ酸残基からなる配列であり、

Thr Asn Ser Asp Gly Leu Val Ile His Asp Gly Thr Trp Thr Tyr Lys

配列番号1に示すアミノ酸配列の第1,234番目から第1,249番目、又は、配列番号3に示すアミノ酸配列の第1,226番目から第1,241番目までに相当することが判明した。

【0045】

第3は、以下に示す 20 アミノ酸残基からなる配列であり、

Ser Ile Glu Glu Leu His Arg Leu Phe Asp Ser Ser Trp Phe Asp Asp Ser Ser Val Lys

配列番号1に示すアミノ酸配列の第253番目から第272番目までに相当することが判明した。

【0046】

第4は、以下に示す 21 アミノ酸残基からなる配列であり、

Val Gly Ala Glu Ile Gln Ala Ser Gly Glu Ala Val Tyr Val Asp Asp Ile Pro Ala Pro Lys

配列番号1に示すアミノ酸配列の第591番目から第611番目までに相当することが判明した。

【0047】

さらに、これらの分解ペプチド試料の一部を用いて MALDI-TOF で分子量を測定し、得られたアミノ酸配列の正確さを検定した。

【0048】

実施例5 (トウモロコシ幼葉鞘全RNA の調製・cDNA 合成)

実施例1に準じて、トウモロコシ種子を発芽させ実生から幼葉鞘先端部 7 g を採取した。これを液体窒素 10 ml 中で凍結させ、乳鉢・乳棒により磨碎し、細かい粉末状にした。液体窒素を気化させた後、常法(グアニジンチオシアネート / 塩化セシウム法)を用いて RNA 抽出を行い、この抽出液からエタノール沈澱により全 RNA 1 mg を回収した。

【0049】

実施例6 (Oligo DNA プライマーの作製と RT-PCR)

実施例4において決定した部分アミノ酸配列をコードすると予測されるoligo DNA の混合物を、センス、アンチセンス両方向について合成した。

【0050】

即ち、実施例4に記載された部分アミノ酸配列2の内、Val Ile His Asp Gly Thr Trp Thr の8個のアミノ酸残基からなる配列から予測される塩基配列として、アンチセンス方向に 5'-GTCCAIGTICC(AG)TC(AG)TGIATAC-3' の 23-mer を合成した。

【0051】

さらに、実施例4に記載された部分アミノ酸配列4の内、Gly Glu Ala Val Tyr Val Asp Asp の8個のアミノ酸残基からなる配列から予測される塩基配列として、センス方向に 5'-GGIGA(AG)GCIGTITA(TC)GTIGA(TC)GA-3' の 23-mer を合成した。

【0052】

それらのうち、antisense 方向に合成したものをプライマーとして、実施例5において単離した全 RNA を鋳型として、市販の逆転写 PCR キット (RNA-PCR kit ; Perkin-Elmer Cetus Instruments 社製) を用いて逆転写反応を行った。該逆転写産物に、sense 方向に合成した Oligo DNA を加えて再度 PCR を行ったところ、約 2Kbp の cDNA 断片の増幅が確認された。

【0053】

実施例7 (PCR 増幅断片のベクターへのクローニングと構造解析)

実施例6で得られた増幅 cDNA 断片を精製し、プラスミドベクター pCRII (Invitrogen 社製) にクローニングした。さらに、該プラスミドベクターのインサート部分の塩基配列決定を、ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems 社製) を用いて、373A DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製) により行い、該 cDNA 断片の構造を決定した。その結果、クローニングされた cDNA 断片には構造の異なる2種のものがあり、一方は配列番号2に示す塩基配列の内 第1,839番目から第3,785番目までに相当し、他方は配列番号4に示す塩基配列の内 第1,858番目から第3,806番目までに相当することが明らかとなった。

## 【0054】

## 実施例8 (完全長 cDNA クローンの単離)

実施例7で得られた塩基配列情報をもとにして、該2種の cDNA 断片にそれぞれ特異的な塩基配列を検索し、その部分に対する oligo DNA をセンス、アンチセンス方向に合成した。

## 【0055】

即ち、配列番号2の塩基配列に対応するセンス oligo DNA として、  
 5'-GCTGGTCAAAATATTGGTGTCTGATTG-3' の 28-mer (共通)、及び、  
 5'-GATTGCTGAAACACAAAGATATGCTAAT-3' の 28-mer、  
 の2種を、アンチセンス oligo DNA として、

5'-TGGCTGCAGATTTTCTGTGCTATACTC-3' の 27-mer (共通)、  
 5'-TGCTTTGCAGCCATATTAGCATATCTT-3' の 27-mer、  
 5'-ACAGCCTTTTGGGAAGCCACCTGGA-3' の 24-mer、及び、  
 5'-ATCGGACTTGTGTGCGCCTTGAC-3' の 24-mer、

の4種を合成した。

## 【0056】

また、配列番号4の塩基配列に対応するセンス oligo DNA として、  
 5'-GCTGGTCAAAATATTGGTGTCTGATTG-3' の 28-mer (共通)、及び、  
 5'-GATTGCTCAAACACAGAAGTATGCCTAC-3' の 28-mer、  
 の2種を、アンチセンス oligo DNA として、

5'-TGGCTGCAGATTTTCTGTGCTATACTC-3' の 27-mer (共通)、  
 5'-CTTTGCCGCCATGTAGGCATACTTC-3' の 25-mer、及び、  
 5'-TTCCACCTATGGTTGCAGTGTTC-3' の 24-mer、

の3種を合成した。

## 【0057】

これらをプライマーとして、市販の Marathon cDNA Amplification kit (Clontech 社製) を用いて RACE 法を行い、5'-方向、及び、3'-方向のそれぞれ末端を含む cDNA 断片を得た。さらにそれらを連結し、全長 cDNA を得た後、プラスミドベクター pCRII (Invitrogen 社製) にクローニングした。

## 【0058】

## 実施例9 (cDNA クローンの塩基配列解析とアミノ酸配列の決定)

実施例8で得られた2種の cDNA クローンについて、それぞれ、ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kits、Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 社製) を用いて、373A DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製) により塩基配列の解析を行った。本発明遺伝子は、4,412 bp 又は 4,359 bp からなる cDNA であることが明らかとなった(配列番号2又は4参照)。

## 【0059】

さらに該塩基配列から、GENETYX 遺伝子解析ソフトウェア (SDC ソフトウェア開発社製) により本発明遺伝子がコードする全アミノ酸配列を決定した。それぞれ、1,358 個又は 1,349 個のアミノ酸残基からなるタンパク質であることが明らかとなった(配列番号1又は3参照)。

## 【0060】

## 実施例10 (直接導入用アルデヒドオキシダーゼ発現プラスミドの構築)

トウモロコシ由来の本発明遺伝子を植物細胞に導入して発現させるために、例えば、以下のような植物用直接導入発現ベクターを構築する。

## 【0061】

pUC19 由来の GUS 発現ベクター pBI221 (Clontech 社製) を、制限酵素 SmaI 及び SacI (いずれも宝酒造製) で消化して GUS 構造遺伝子を取り除いた 2.8 Kbp 断片を回収し、T4 DNA polymerase (宝酒造製) を用いて末端を平滑化する。さらに、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (宝酒造製) により末端の脱リン酸処理を行う。

## 【0062】

一方、実施例8で得られた完全長 cDNA をインサート遺伝子として準備し、同様に T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化後、両者を T4 DNA ligase (DNA ライゲーションキット ver. 2: 宝酒造製) を用いてつなぎ合わせ、大腸菌 HB101 株コンピテントセル (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン耐性株を選抜する。さらに、選抜株から増幅させた組換えプラスミドの内、カリフラワーモザイ

クウィルス由来 35S プロモーター、ノパリンシンターゼ由来ターミネーターに対して、アルデヒドオキシダーゼのコード領域が順方向に挿入されたクローンと逆方向に挿入されたクローンを選別し、それぞれ、直接導入用発現ベクターとする。

## 【0063】

## 実施例 11 (間接導入用アルデヒドオキシダーゼ発現プラスミドの構築)

トウモロコシ由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子を植物細胞に導入して発現させるために、例えば、以下のような植物用間接導入発現ベクターを構築する。

## 【0064】

参考例 1 と同様に、末端を平滑化したアルデヒドオキシダーゼ遺伝子断片をインサート遺伝子として準備する。一方、pBIN19 由来の GUS 発現バイナリーベクター pBI121 (Clontech 製) を、制限酵素 SmaI 及び SacI で消化して GUS 構造遺伝子を取り除いた断片を回収し、同様に末端を平滑化し、脱リン酸処理を行う。両者をつなぎ合わせ、大腸菌を形質転換し、組換えプラスミドを選抜し、間接導入用アルデヒドオキシダーゼ発現ベクターを得る。さらに、トリペアレンタル法 (tri-parental 法; GUS gene fusion system: Clontech 社製) により、プラスミドベクターを Agrobacterium tumefaciens LBA4404 株に移す。

## 【0065】

## 実施例 12 (アルデヒドオキシダーゼ発現プラスミド導入形質転換植物の作出: その 1)

実施例 10 で得られる直接導入発現ベクターを、島田ら著、育種学雑誌、1994 年、第 44 巻別冊 1 号、66 頁に記載されている方法で、パーティクルガンによりイネ無菌培養未熟胚盤に導入し、形質転換イネ植物を得る。同様に、宅見ら著、育種学雑誌、1995 年、第 45 巻別冊 1 号、57 頁に記載されている方法で、パーティクルガンによりコムギ無菌培養未熟胚盤に導入し、形質転換コムギ植物を得る。同様に、萩尾ら著、育種学雑誌、1994 年、第 44 巻別冊 1 号、67 頁に記載されている方法で、パーティクルガンによりオオムギ無菌培養未熟胚盤に導入し、形質転換オオムギ植物を得る。同様に、M.E. Fromm ら著、BIO/TECHNOLOGY、1990 年、第 8 巻、833-839 頁に記載されている方法で、パーティクル



ガンによりトウモロコシ不定胚に導入し、形質転換トウモロコシ植物を得る。さらに、実施例10で得られる直接導入発現ベクターを、特願平3-291501に記載されている方法で、パーティクルガンによりダイズ不定胚に導入し、形質転換ダイズ植物を得る。

## 【0066】

実施例13 (アルデヒドオキシダーゼ発現ベクター導入形質転換植物の作出:  
その2)

実施例11で得られる間接導入発現ベクターが導入された Agrobacterium tumefaciens LBA4404 株を、内宮著、植物遺伝子操作マニュアル、1990年、講談社サイエンティフィク (ISBN4-06-153513-7)、27-33頁に記載されている方法で、タバコ無菌培養葉片に感染させ、形質転換タバコ植物を得る。同様に、N. Pawlicki ら著、Plant Cell, Tissue and Organ Culture、1992年、31巻、129-139頁に記載されている方法で、ニンジン無菌培養実生の葉柄に感染させ、形質転換ニンジン植物を得る。また、長澤ら著、育種学雑誌、1995年、第45巻別冊1号、143頁に記載されている方法で、ミヤコグサ無菌培養実生の下胚軸あるいは子葉に感染させ、形質転換ミヤコグサを得る。同様に、R. Desgagnes ら著、Plant Cell Tissue and Organ Culture、1995年、42巻、129-140頁に記載されている方法で、アルファルファ無菌培養不定胚に感染させ、形質転換アルファルファを得る。同様に、J. Puonti-Kaerlas ら著、Theoretical and Applied Genetics 1990年、80巻、246-252頁に記載されている方法で、エンドウ無菌発芽実生の上胚軸あるいは子葉に感染させ、形質転換エンドウを得る。

## 【0067】

## 【発明の効果】

本発明により、植物由来のアルデヒドオキシダーゼ遺伝子を提供することが可能になった。

## 【0068】

## 【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:1,358

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の起源：

生物名：トウモロコシ (Zea mays L.)

株名：品種 ゴールデンクロスバンタム70

配列

	5	10	15
Met Gly Lys Glu Ala Gly Ala Ala Glu Ser Ser Thr Val Val Leu Ala			
20	25	30	
Val Asn Gly Lys Arg Tyr Glu Ala Ala Gly Val Ala Pro Ser Thr Ser			
35	40	45	
Leu Leu Glu Phe Leu Arg Thr Gln Thr Pro Val Arg Gly Pro Lys Leu			
50	55	60	
Gly Cys Gly Glu Gly Gly Cys Gly Ala Cys Val Val Leu Val Ser Lys			
65	70	75	80
Tyr Asp Pro Ala Thr Asp Glu Val Thr Glu Phe Ser Ala Ser Ser Cys			
85	90	95	
Leu Thr Leu Leu His Ser Val Asp Arg Cys Ser Val Thr Thr Ser Glu			
100	105	110	
Gly Ile Gly Asn Thr Arg Asp Gly Tyr His Pro Val Gln Gln Arg Leu			
115	120	125	
Ser Gly Phe His Ala Ser Gln Cys Gly Phe Cys Thr Pro Gly Met Cys			
130	135	140	
Met Ser Ile Phe Ser Ala Leu Val Lys Ala Asp Asn Lys Ser Asp Arg			
145	150	155	160
Pro Asp Pro Pro Ala Gly Phe Ser Lys Ile Thr Thr Ser Glu Ala Glu			
165	170	175	
Lys Ala Val Ser Gly Asn Leu Cys Arg Cys Thr Gly Tyr Arg Pro Ile			

180	185	190
Val Asp Thr Cys Lys Ser Phe Ala Ser Asp Val Asp Leu Glu Asp Leu		
195	200	205
Gly Leu Asn Cys Phe Trp Lys Lys Gly Glu Glu Pro Ala Glu Val Ser		
210	215	220
Arg Leu Pro Gly Tyr Asn Ser Gly Ala Val Cys Thr Phe Pro Glu Phe		
225	230	235
Leu Lys Ser Glu Ile Lys Ser Thr Met Lys Gln Val Asn Asp Val Pro		
245	250	255
Ile Ala Ala Ser Gly Asp Gly Trp Tyr His Pro Lys Ser Ile Glu Glu		
260	265	270
Leu His Arg Leu Phe Asp Ser Ser Trp Phe Asp Asp Ser Ser Val Lys		
275	280	285
Ile Val Ala Ser Asn Thr Gly Ser Gly Val Tyr Lys Asp Gln Asp Leu		
290	295	300
Tyr Asp Lys Tyr Ile Asp Ile Lys Gly Ile Pro Glu Leu Ser Val Ile		
305	310	315
Asn Lys Asn Asp Lys Ala Ile Glu Leu Gly Ser Val Val Ser Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Ile Glu Val Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Phe Arg Lys Ile		
340	345	350
Ala Asp His Leu Asn Lys Val Ala Ser Pro Phe Val Arg Asn Thr Ala		
355	360	365
Thr Ile Gly Gly Asn Ile Met Met Ala Gln Arg Leu Pro Phe Glu Ser		
370	375	380
Asp Val Ala Thr Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Thr Val Thr Val Gln		
385	390	395
Val Ala Ser Lys Arg Leu Cys Phe Thr Leu Glu Glu Phe Leu Glu Gln		
405	410	415

Pro Pro Cys Asp Ser Arg Thr Leu Leu Leu Ser Ile Phe Ile Pro Glu  
420 425 430

Trp Gly Ser Asp Tyr Val Thr Phe Glu Thr Phe Arg Ala Ala Pro Arg  
435 440 445

Pro Phe Gly Asn Ala Val Ser Tyr Val Asn Ser Ala Phe Leu Ala Arg  
450 455 460

Thr Ser Gly Ser Leu Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Ala Phe Gly Ala  
465 470 475 480

Tyr Gly Val Asp His Ala Ile Arg Ala Lys Lys Val Glu Asp Phe Leu  
485 490 495

Lys Gly Lys Ser Leu Ser Ser Phe Val Ile Leu Glu Ala Ile Lys Leu  
500 505 510

Leu Lys Asp Thr Val Ser Pro Ser Glu Gly Thr Thr His His Glu Tyr  
515 520 525

Arg Val Ser Leu Ala Val Ser Phe Leu Phe Ser Phe Leu Ser Ser Leu  
530 535 540

Ala Asn Ser Ser Ser Ala Pro Ser Asn Ile Asp Thr Pro Asn Gly Ser  
545 550 555 560

Tyr Thr His Glu Thr Gly Ser Asn Val Asp Ser Pro Glu Arg His Ile  
565 570 575

Lys Val Asp Ser Asn Asp Leu Pro Ile Arg Ser Arg Gln Glu Met Val  
580 585 590

Phe Ser Asp Glu Tyr Lys Pro Val Gly Lys Pro Ile Lys Lys Val Gly  
595 600 605

Ala Glu Ile Gln Ala Ser Gly Glu Ala Val Tyr Val Asp Asp Ile Pro  
610 615 620

Ala Pro Lys Asp Cys Leu Tyr Gly Ala Phe Ile Tyr Ser Thr His Pro  
625 630 635 640

His Ala His Val Arg Ser Ile Asn Phe Lys Ser Ser Leu Ala Ser Gln

645	650	655
Lys Val Ile Thr Val Ile Thr Ala Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly Glu		
660	665	670
Asn Ile Gly Ser Ser Phe Leu Met Gln Gly Glu Ala Leu Phe Ala Asp		
675	680	685
Pro Ile Ala Glu Phe Ala Gly Gln Asn Ile Gly Val Val Ile Ala Glu		
690	695	700
Thr Gln Arg Tyr Ala Asn Met Ala Ala Lys Gln Ala Val Val Glu Tyr		
705	710	715
Ser Thr Glu Asn Leu Gln Pro Pro Ile Leu Thr Ile Glu Asp Ala Ile		
725	730	735
Gln Arg Asn Ser Tyr Ile Gln Ile Pro Pro Phe Leu Ala Pro Lys Pro		
740	745	750
Val Gly Asp Tyr Asn Lys Gly Met Ala Glu Ala Asp His Lys Ile Leu		
755	760	765
Ser Ala Glu Val Lys Leu Glu Ser Gln Tyr Tyr Phe Tyr Met Glu Thr		
770	775	780
Gln Ala Ala Leu Ala Ile Pro Asp Glu Asp Asn Cys Ile Thr Ile Tyr		
785	790	795
Ser Ser Thr Gln Met Pro Glu Leu Thr Gln Asn Leu Ile Ala Arg Cys		
805	810	815
Leu Gly Ile Pro Phe His Asn Val Arg Val Ile Ser Arg Arg Val Gly		
820	825	830
Gly Gly Phe Gly Gly Lys Ala Met Lys Ala Thr His Thr Ala Cys Ala		
835	840	845
Cys Ala Leu Ala Ala Phe Lys Leu Arg Arg Pro Val Arg Met Tyr Leu		
850	855	860
Asp Arg Lys Thr Asp Met Ile Met Ala Gly Gly Arg His Pro Met Lys		
865	870	875
		880

Ala Lys Tyr Ser Val Gly Phe Lys Ser Asp Gly Lys Ile Thr Ala Leu  
885 890 895  
His Leu Asp Leu Gly Ile Asn Ala Gly Ile Ser Pro Asp Val Ser Pro  
900 905 910  
Leu Met Pro Arg Ala Ile Ile Gly Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Trp Gly  
915 920 925  
Thr Leu Glu Phe Asp Thr Lys Val Cys Lys Thr Asn Val Ser Ser Lys  
930 935 940  
Ser Ala Met Arg Ala Pro Gly Asp Val Gln Gly Ser Phe Ile Ala Glu  
945 950 955 960  
Ala Ile Ile Glu His Val Ala Ser Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Thr  
965 970 975  
Val Arg Arg Lys Asn Leu His Asp Phe Glu Ser Leu Glu Val Phe Tyr  
980 985 990  
Gly Glu Ser Ala Gly Glu Ala Ser Thr Tyr Ser Leu Val Ser Met Phe  
995 1000 1005  
Asp Lys Leu Ala Leu Ser Pro Glu Tyr Gln His Arg Ala Ala Met Ile  
1010 1015 1020  
Glu Gln Phe Asn Ser Ser Asn Lys Trp Lys Lys Arg Gly Ile Ser Cys  
1025 1030 1035 1040  
Val Pro Ala Thr Tyr Glu Val Asn Leu Arg Pro Thr Pro Gly Lys Val  
1045 1050 1055  
Ser Ile Met Asn Asp Gly Ser Ile Ala Val Glu Val Gly Gly Ile Glu  
1060 1065 1070  
Ile Gly Gln Gly Leu Trp Thr Lys Val Lys Gln Met Thr Ala Phe Gly  
1075 1080 1085  
Leu Gly Gln Leu Cys Pro Asp Gly Gly Glu Cys Leu Leu Asp Lys Val  
1090 1095 1100  
Arg Val Ile Gln Ala Asp Thr Leu Ser Leu Ile Gln Gly Gly Met Thr

1105	1110	1115	1120
Ala Gly Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ser Cys Glu Thr Val Arg Gln Ser			
1125	1130	1135	
Cys Val Ala Leu Val Glu Lys Leu Asn Pro Ile Lys Glu Ser Leu Glu			
1140	1145	1150	
Ala Lys Ser Asn Thr Val Glu Trp Ser Ala Leu Ile Ala Gln Ala Ser			
1155	1160	1165	
Met Ala Ser Val Asn Leu Ser Ala Gln Pro Tyr Trp Thr Pro Asp Pro			
1170	1175	1180	
Ser Phe Lys Ser Tyr Leu Asn Tyr Gly Ala Gly Thr Ser Glu Val Glu			
1185	1190	1195	1200
Val Asp Ile Leu Thr Gly Ala Thr Thr Ile Leu Arg Ser Asp Leu Val			
1205	1210	1215	
Tyr Asp Cys Gly Gln Ser Leu Asn Pro Ala Val Asp Leu Gly Gln Ile			
1220	1225	1230	
Glu Gly Cys Phe Val Gln Gly Ile Gly Phe Phe Thr Asn Glu Asp Tyr			
1235	1240	1245	
Lys Thr Asn Ser Asp Gly Leu Val Ile His Asp Gly Thr Trp Thr Tyr			
1250	1255	1260	
Lys Ile Pro Thr Val Asp Asn Ile Pro Lys Glu Phe Asn Val Glu Met			
1265	1270	1275	1280
Phe Asn Ser Ala Pro Asp Lys Lys Arg Val Leu Ser Ser Lys Ala Ser			
1285	1290	1295	
Gly Glu Pro Pro Leu Val Leu Ala Thr Ser Val His Cys Ala Met Arg			
1300	1305	1310	
Glu Ala Ile Arg Ala Ala Arg Lys Glu Phe Ser Val Ser Thr Ser Pro			
1315	1320	1325	
Ala Lys Ser Ala Val Thr Phe Gln Met Asp Val Pro Ala Thr Met Pro			
1330	1335	1340	

Val Val Lys Glu Leu Cys Gly Leu Asp Val Val Glu Arg Tyr Leu Glu  
1345 1350 1355

Asn Val Ser Ala Ala Ser Ala Gly Pro Asn Thr Ala Lys Ala

【0069】

配列番号：2

配列の長さ：4,412

配列の形：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の起源：

生物名：トウモロコシ (Zea mays L.)

株名：品種 ゴールデンドロクロソバンタム70

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：46..4120 (終始コドンを含む)

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CTG TGT TGT GCT GTG CTG CGT GCT GTG GAG GGG GAG GAG GAG ATG	48
GGG AAG GAG GCA GGG GCA GCG GAG TCG TCG ACG GTG GTG CTG GCC GTC	96
AAC GGC AAG CGC TAC GAG GCG GCC GGC GTG GCT CCG TCC ACG TCG CTG	144
CTG GAG TTC CTC CGC ACC CAG ACG CCC GTC AGA GGC CCC AAG CTC GGC	192
TGC GGC GAA GGT GGC TGC GGT GCA TGC GTG GTC CTC GTC TCC AAG TAC	240
GAC CCG GCC ACG GAC GAG GTG ACC GAG TTC TCT GCC AGC TCC TGC CTG	288
ACG CTG CTC CAC AGC GTG GAC CGC TGC TCA GTG ACC ACC AGC GAG GGA	336
ATC GGC AAC ACC AGG GAT GGC TAC CAC CCC GTG CAG CAG CGC CTC TCC	384
GGC TTC CAC GCC TCG CAG TGC GGC TTC TGC ACA CCC GGC ATG TGC ATG	432
TCC ATC TTC TCC GCC CTT GTC AAG GCC GAC AAC AAG TCC GAT CGC CCG	480
GAC CCT CCT GCT GGC TTC TCC AAG ATC ACT ACC TCG GAG GCA GAG AAG	528



GCT GTC TCG GGC AAC CTT TGT CGT TGC ACC GGA TAC AGA CCC ATT GTT 576  
 GAC ACC TGC AAA AGC TTT GCC TCT GAT GTT GAC CTC GAG GAC CTA GGC 624  
 CTC AAC TGT TTC TGG AAG AAG GGC GAA GAA CCT GCA GAA GTC AGC AGG 672  
 CTG CCG GGG TAC AAC AGC GGT GCC GTC TGC ACC TTT CCA GAG TTT CTC 720  
 AAA TCC GAA ATC AAG TCT ACT ATG AAG CAG GTG AAC GAT GTC CCC ATT 768  
 GCA GCC TCA GGT GAT GGC TGG TAC CAT CCT AAG AGC ATT GAA GAG CTT 816  
 CAC AGG TTG TTT GAT TCC AGC TGG TTT GAT GAC AGT TCT GTG AAG ATT 864  
 GTT GCT TCA AAC ACT GGG TCT GGA GTG TAC AAG GAT CAG GAC CTC TAC 912  
 GAC AAG TAC ATT GAC ATC AAA GGA ATC CCA GAG CTT TCA GTC ATC AAT 960  
 AAA AAC GAC AAA GCA ATT GAG CTT GGA TCA GTT GTG TCC ATC TCT AAA 1008  
 GCT ATT GAA GTG CTG TCA GAT GGA AAT TTG GTC TTC AGA AAG ATT GCT 1056  
 GAT CAC CTC AAC AAA GTG GCT TCA CCG TTT GTT CGG AAC ACT GCA ACC 1104  
 ATA GGA GGA AAC ATA ATG ATG GCA CAA AGG TTG CCA TTT GAA TCG GAT 1152  
 GTT GCA ACC GTG CTC CTA GCT GCG GGT TCG ACA GTC ACA GTC CAG GTG 1200  
 GCT TCC AAA AGG CTG TGC TTC ACT CTG GAG GAA TTC TTG GAA CAA CCT 1248  
 CCA TGT GAT TCT AGG ACC CTG CTG CTG AGC ATA TTT ATC CCA GAA TGG 1296  
 GGT TCA GAC TAT GTC ACC TTT GAG ACT TTC CGA GCC GCC CCA CGA CCA 1344  
 TTT GGA AAT GCT GTC TCT TAT GTA AAC TCT GCT TTC TTG GCA AGG ACA 1392  
 TCA GGC AGC CTT CTA ATT GAG GAT ATA TGC TTG GCA TTT GGT GCC TAC 1440  
 GGA GTC GAT CAT GCC ATC AGA GCT AAG AAG GTT GAA GAT TTC TTG AAG 1488  
 GGA AAA TCG CTG AGC TCA TTT GTG ATA CTT GAA GCA ATT AAA CTA CTC 1536  
 AAA GAT ACC GTT TCA CCA TCA GAA GGC ACT ACA CAT CAT GAA TAC AGG 1584  
 GTC AGC TTG GCT GTC AGT TTC TTG TTC AGT TTC TTA TCT TCC CTT GCC 1632  
 AAC AGT TCG AGT GCA CCA TCA AAT ATT GAT ACT CCC AAT GGG TCA TAT 1680  
 ACT CAT GAA ACT GGT AGC AAT GTG GAC TCA CCT GAG AGG CAT ATT AAG 1728  
 GTT GAC AGC AAT GAT TTG CCA ATT CGT TCA AGA CAA GAA ATG GTT TTC 1776  
 AGC GAT GAG TAC AAG CCT GTT GGC AAG CCG ATC AAG AAA GTC GGG GCA 1824  
 GAG ATC CAA GCA TCA GGG GAG GCT GTG TAC GTT GAT GAT ATC CCT GCT 1872  
 CCC AAG GAT TGC CTC TAT GGA GCA TTT ATC TAC AGC ACA CAT CCT CAT 1920

GCT CAT GTG AGA AGT ATC AAC TTC AAA TCA TCC TTG GCT TCA CAG AAG 1968  
 GTC ATC ACA GTT ATA ACC GCA AAG GAT ATT CCA AGC GGT GGA GAA AAT 2016  
 ATT GGA AGC AGC TTC CTG ATG CAA GGA GAA GCA CTA TTT GCA GAT CCA 2064  
 ATC GCT GAA TTT GCT GGT CAA AAT ATT GGT GTC GTG ATT GCT GAA ACA 2112  
 CAA AGA TAT GCT AAT ATG GCT GCA AAG CAA GCT GTT GTT GAG TAT AGC 2160  
 ACA GAA AAT CTG CAG CCA CCA ATT CTG ACA ATA GAA GAT GCC ATC CAA 2208  
 AGA AAC AGC TAC ATC CAA ATT CCC CCA TTT TTA GCT CCA AAG CCA GTT 2256  
 GGT GAC TAC AAC AAA GGG ATG GCT GAA GCA GAC CAC AAG ATT CTA TCA 2304  
 GCA GAG GTA AAA CTT GAA TCC CAG TAC TAC TTC TAC ATG GAA ACT CAA 2352  
 GCA GCA CTA GCG ATT CCT GAT GAA GAT AAC TGC ATA ACA ATC TAT TCC 2400  
 TCG ACA CAA ATG CCT GAG CTC ACA CAA AAT TTG ATA GCA AGG TGT CTT 2448  
 GGC ATT CCA TTT CAC AAT GTC CGT GTC ATC AGC AGA AGA GTA GGA GGA 2496  
 GGC TTT GGT GGA AAG GCA ATG AAA GCA ACG CAT ACT GCA TGT GCA TGT 2544  
 GCC CTT GCT GCC TTC AAG CTG CGG CGT CCA GTT AGG ATG TAC CTC GAT 2592  
 CGC AAG ACG GAC ATG ATA ATG GCT GGA GGG AGA CAT CCA ATG AAG GCG 2640  
 AAG TAC TCT GTT GGG TTC AAG TCA GAT GGC AAG ATC ACA GCC TTG CAC 2688  
 CTA GAT CTT GGA ATC AAT GCT GGA ATA TCA CCA GAT GTG AGT CCA TTG 2736  
 ATG CCA CGT GCT ATC ATA GGA GCT CTC AAA AAG TAC AAC TGG GGC ACT 2784  
 CTT GAA TTT GAC ACC AAG GTC TGC AAG ACA AAT GTC TCA TCA AAG TCA 2832  
 GCA ATG CGA GCT CCT GGA GAT GTG CAG GGC TCT TTC ATC GCT GAA GCC 2880  
 ATC ATC GAG CAT GTT GCC TCA GCA CTC GCA CTA GAC ACT AAC ACC GTC 2928  
 AGG AGG AAG AAC CTT CAT GAT TTT GAA AGC CTT GAA GTT TTC TAT GGA 2976  
 GAA AGT GCA GGT GAA GCT TCT ACA TAC AGC CTG GTT TCC ATG TTT GAC 3024  
 AAG CTG GCC TTG TCT CCA GAA TAC CAG CAC AGG GCT GCA ATG ATT GAG 3072  
 CAG TTC AAT AGC AGC AAC AAA TGG AAG AAA CGC GGC ATT TCT TGT GTG 3120  
 CCA GCC ACT TAT GAG GTT AAT CTT CGA CCA ACT CCA GGC AAG GTG TCA 3168  
 ATC ATG AAT GAT GGT TCC ATC GCT GTC GAG GTT GGA GGA ATT GAG ATA 3216  
 GGT CAA GGA TTG TGG ACT AAA GTG AAG CAG ATG ACG GCC TTT GGA CTG 3264  
 GGA CAG CTG TGT CCT GAT GGT GGC GAA TGC CTT CTG GAC AAG GTT CGG 3312

GTT ATC CAG GCA GAC ACA TTA AGC CTG ATC CAA GGA GGT ATG ACT GCT 3360  
 GGG AGC ACC ACT TCT GAA ACT AGC TGT GAA ACA GTT CGG CAA TCT TGT 3408  
 GTT GCA CTG GTT GAG AAG CTG AAC CCT ATC AAG GAG AGT CTC GAA GCT 3456  
 AAG TCC AAC ACA GTG GAA TGG AGT GCC TTG ATT GCT CAG GCA AGC ATG 3504  
 GCG AGT GTG AAC CTA TCA GCA CAG CCG TAC TGG ACT CCT GAT CCA TCT 3552  
 TTC AAG AGC TAC TTG AAC TAC GGA GCT GGC ACC AGT GAG GTG GAA GTT 3600  
 GAT ATC CTA ACA GGA GCA ACC ACA ATT CTG CGA AGC GAC CTG GTG TAT 3648  
 GAC TGC GGG CAG AGC CTA AAC CCT GCT GTA GAC TTG GGC CAG ATC GAG 3696  
 GGC TGC TTT GTC CAA GGA ATA GGG TTC TTC ACG AAC GAG GAC TAC AAG 3744  
 ACG AAT TCC GAC GGG TTG GTC ATC CAC GAC GGC ACA TGG ACG TAC AAG 3792  
 ATC CCC ACG GTG GAT AAT ATC CCG AAG GAG TTC AAT GTT GAG ATG TTT 3840  
 AAC AGC GCC CCT GAC AAG AAG CGT GTC CTA TCT TCC AAA GCG TCG GGC 3888  
 GAG CCG CCG CTG GTT CTC GCA ACC TCG GTG CAC TGC GCG ATG AGG GAG 3936  
 GCC ATC AGG GCG GCG AGG AAG GAG TTC TCG GTC AGC ACC AGC CCC GCG 3984  
 AAA TCC GCC GTC ACA TTC CAG ATG GAC GTG CCG GCG ACG ATG CCT GTC 4032  
 GTC AAG GAG CTC TGC GGC CTC GAC GTC GTG GAG AGG TAC CTC GAG AAC 4080  
 GTG TCT GCC GCC AGT GCC GGC CCA AAC ACA GCG AAA GCA TAG ATC CAG 4128  
 CAG GCC TCA GGG TGC AGT CGG CGC ACT GCC AGA GAT GAT GTG TGC TGC 4176  
 CCT GAT GTA CAG ACA GTA CAG TAC AGA GGA GAG AGA ATT GGG GGA ACT 4224  
 CAG GAA CTG CGA GGA GCG ATG AAC AGT ATA TAG AGT GAA AAA TAA AAG 4272  
 TGC TTC GTA CTA ATA ATC ACT AGA AAA AAT TAT GCA CAT CTC CCA CGC 4320  
 ACT ACC GGC ACG ACT GTT GAA TAT TTT GTA AAA TAA GAT GTC ATA AGC 4368  
 TAT TTA TTT TCT GTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 4412

【0070】

配列番号：3

配列の長さ：1,349

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の起源:

生物名: トウモロコシ (Zea mays L.)

株名: 品種 ゴールデンクロスバンタム70

配列

	5		10		15										
Met	Glu	Met	Gly	Lys	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Val	Asn	Gly	Lys
	20		25		30										
Arg	Tyr	Glu	Ala	Ala	Gly	Val	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu	Leu	Glu	Phe
	35		40		45										
Leu	Arg	Thr	His	Thr	Pro	Val	Arg	Gly	Pro	Lys	Leu	Gly	Cys	Gly	Glu
	50		55		60										
Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Cys	Val	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ala
	65		70		75										80
Thr	Asp	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ser	Ala	Ser	Ser	Cys	Leu	Thr	Leu	Leu
	85		90		95										
His	Ser	Val	Asp	Arg	Cys	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ile	Gly	Asn
	100		105		110										
Thr	Lys	Asp	Gly	Tyr	His	Pro	Val	Gln	Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Phe	His
	115		120		125										
Ala	Ser	Gln	Cys	Gly	Phe	Cys	Thr	Pro	Gly	Met	Cys	Met	Ser	Ile	Phe
	130		135		140										
Ser	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Asn	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro
	145		150		155										160
Ala	Gly	Phe	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Val	Ser
	165		170		175										
Gly	Asn	Leu	Cys	Arg	Cys	Thr	Gly	Tyr	Arg	Pro	Ile	Val	Asp	Ala	Cys
	180		185		190										
Lys	Ser	Phe	Ala	Ala	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Leu	Asn	Cys
	195		200		205										

Phe Trp Lys Lys Gly Asp Glu Pro Ala Asp Val Ser Lys Leu Pro Gly  
 210 215 220  
 Tyr Asn Ser Gly Asp Val Cys Thr Phe Pro Asp Phe Leu Lys Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Met Lys Ser Ser Ile Gln Gln Ala Asn Ser Ala Pro Val Pro Val Ser  
 245 250 255  
 Asp Asp Gly Trp Tyr Arg Pro Arg Ser Ile Asp Glu Leu His Arg Leu  
 260 265 270  
 Phe Gln Ser Ser Ser Phe Asp Glu Asn Ser Val Lys Ile Val Ala Ser  
 275 280 285  
 Asn Thr Gly Ser Gly Val Tyr Lys Asp Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Tyr  
 290 295 300  
 Ile Asp Ile Lys Gly Ile Pro Glu Leu Ser Val Ile Asn Arg Asn Asp  
 305 310 315 320  
 Lys Gly Ile Glu Leu Gly Ser Val Val Ser Ile Ser Lys Ala Ile Glu  
 325 330 335  
 Val Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Phe Arg Lys Ile Ala Gly His Leu  
 340 345 350  
 Asn Lys Val Ala Ser Pro Phe Val Arg Asn Thr Ala Thr Ile Gly Gly  
 355 360 365  
 Asn Ile Val Met Ala Gln Arg Leu Pro Phe Ala Ser Asp Ile Ala Thr  
 370 375 380  
 Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ser Thr Val Thr Ile Gln Val Ala Ser Lys  
 385 390 395 400  
 Arg Leu Cys Phe Thr Leu Glu Glu Phe Leu Gln Gln Pro Pro Cys Asp  
 405 410 415  
 Ser Arg Thr Leu Leu Leu Ser Ile Phe Ile Pro Glu Trp Gly Ser Asn  
 420 425 430  
 Asp Val Thr Phe Glu Thr Phe Arg Ala Ala Pro Arg Pro Leu Gly Asn

435	440	445
Ala Val Ser Tyr Val Asn Ser Ala Phe Leu Ala Arg Thr Ser Leu Asp		
450	455	460
Ala Ala Ser Lys Asp His Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Ala Phe Gly		
465	470	475
Ala Tyr Gly Ala Asp His Ala Ile Arg Ala Arg Lys Val Glu Asp Tyr		480
	485	490
		495
Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser Ser Ser Val Ile Leu Glu Ala Val Arg		
500	505	510
Leu Leu Lys Gly Ser Ile Lys Pro Ser Glu Gly Ser Thr His Pro Glu		
515	520	525
Tyr Arg Ile Ser Leu Ala Val Ser Phe Leu Phe Thr Phe Leu Ser Ser		
530	535	540
Leu Ala Asn Ser Leu Asn Glu Ser Ala Lys Val Ser Gly Thr Asn Glu		
545	550	555
		560
His Ser Pro Glu Lys Gln Leu Lys Leu Asp Ile Asn Asp Leu Pro Ile		
	565	570
		575
Arg Ser Arg Gln Glu Ile Phe Phe Thr Asp Ala Tyr Lys Pro Val Gly		
580	585	590
Lys Ala Ile Lys Lys Ala Gly Val Glu Ile Gln Ala Ser Gly Glu Ala		
595	600	605
Val Tyr Val Asp Asp Ile Pro Ala Pro Lys Asp Cys Leu Tyr Gly Ala		
610	615	620
Phe Ile Tyr Ser Thr His Pro His Ala His Val Lys Ser Ile Asn Phe		
625	630	635
		640
Lys Pro Ser Leu Ala Ser Gln Lys Ile Ile Thr Val Ile Thr Ala Lys		
	645	650
		655
Asp Ile Pro Ser Gly Gly Gln Asn Val Gly Tyr Ser Phe Pro Met Ile		
660	665	670

Gly Glu Glu Ala Leu Phe Ala Asp Pro Val Ala Glu Phe Ala Gly Gln  
675 680 685

Asn Ile Gly Val Val Ile Ala Gln Thr Gln Lys Tyr Ala Tyr Met Ala  
690 695 700

Ala Lys Gln Ala Ile Ile Glu Tyr Ser Thr Glu Asn Leu Gln Pro Pro  
705 710 715 720

Ile Leu Thr Ile Glu Asp Ala Ile Glu Arg Ser Ser Phe Phe Gln Thr  
725 730 735

Leu Pro Phe Val Ala Pro Lys Pro Val Gly Asp Tyr Asp Lys Gly Met  
740 745 750

Ser Glu Ala Asp His Lys Ile Leu Ser Ala Glu Val Lys Ile Glu Ser  
755 760 765

Gln Tyr Phe Phe Tyr Met Glu Pro Gln Val Ala Leu Ala Ile Pro Asp  
770 775 780

Glu Asp Asn Cys Ile Thr Ile Tyr Phe Ser Thr Gln Leu Pro Glu Ser  
785 790 795 800

Thr Gln Asn Val Val Ala Lys Cys Val Gly Ile Pro Phe His Asn Val  
805 810 815

Arg Val Ile Thr Arg Arg Val Gly Gly Gly Phe Gly Gly Lys Ala Leu  
820 825 830

Lys Ser Met His Val Ala Cys Ala Cys Ala Val Ala Ala Leu Lys Leu  
835 840 845

Gln Arg Pro Val Arg Met Tyr Leu Asp Arg Lys Thr Asp Met Ile Met  
850 855 860

Ala Gly Gly Arg His Pro Met Lys Val Lys Tyr Ser Val Gly Phe Lys  
865 870 875 880

Ser Asn Gly Lys Ile Thr Ala Leu His Leu Asp Leu Gly Ile Asn Gly  
885 890 895

Gly Ile Ser Pro Asp Met Ser Pro Met Ile Ala Ala Pro Val Ile Gly

900	905	910	
Ser Leu Lys Lys Tyr Asn Trp Gly Asn Leu Ala Phe Asp Thr Lys Val			
915	920	925	
Cys Lys Thr Asn Val Ser Ser Lys Ser Ser Met Arg Ala Pro Gly Asp			
930	935	940	
Ala Gln Gly Ser Phe Ile Ala Glu Ala Ile Ile Glu His Val Ala Ser			
945	950	955	960
Ala Leu Ser Ala Asp Thr Asn Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu His Asp			
965	970	975	
Phe Glu Ser Leu Ala Val Phe Phe Gly Asp Ser Ala Gly Glu Ala Ser			
980	985	990	
Thr Tyr Ser Leu Val Thr Met Phe Asp Lys Leu Ala Ser Ser Pro Glu			
995	1000	1005	
Tyr Gln His Arg Ala Glu Met Val Glu Gln Phe Asn Arg Ser Asn Lys			
1010	1015	1020	
Trp Lys Lys Arg Gly Ile Ser Cys Val Pro Val Thr Tyr Glu Val Gln			
1025	1030	1035	1040
Leu Arg Pro Thr Pro Gly Lys Val Ser Ile Met Asn Asp Gly Ser Ile			
1045	1050	1055	
Ala Val Glu Val Gly Gly Val Glu Leu Gly Gln Gly Leu Trp Thr Lys			
1060	1065	1070	
Val Lys Gln Met Thr Ala Phe Gly Leu Gly Gln Leu Cys Pro Gly Gly			
1075	1080	1085	
Gly Glu Ser Leu Leu Asp Lys Val Arg Val Ile Gln Ala Asp Thr Leu			
1090	1095	1100	
Ser Met Ile Gln Gly Gly Val Thr Gly Gly Ser Thr Thr Ser Glu Thr			
1105	1110	1115	1120
Ser Cys Glu Ala Val Arg Lys Ser Cys Val Ala Leu Val Glu Ser Leu			
1125	1130	1135	



Lys Pro Ile Lys Glu Asn Leu Glu Ala Lys Thr Gly Thr Val Glu Trp  
 1140 1145 1150  
 Ser Ala Leu Ile Ala Gln Ala Ser Met Ala Ser Val Asn Leu Ser Ala  
 1155 1160 1165  
 His Ala Tyr Trp Thr Pro Asp Pro Thr Phe Thr Ser Tyr Leu Asn Tyr  
 1170 1175 1180  
 Gly Ala Gly Thr Ser Glu Val Glu Ile Asp Val Leu Thr Gly Ala Thr  
 1185 1190 1195 1200  
 Thr Ile Leu Arg Ser Asp Leu Val Tyr Asp Cys Gly Gln Ser Leu Asn  
 1205 1210 1215  
 Pro Ala Val Asp Leu Gly Gln Val Glu Gly Ala Phe Val Gln Gly Val  
 1220 1225 1230  
 Gly Phe Phe Thr Asn Glu Glu Tyr Ala Thr Asn Ser Asp Gly Leu Val  
 1235 1240 1245  
 Ile His Asp Gly Thr Trp Thr Tyr Lys Ile Pro Thr Val Asp Thr Ile  
 1250 1255 1260  
 Pro Lys Gln Phe Asn Val Glu Leu Ile Asn Ser Ala Arg Asp Gln Lys  
 1265 1270 1275 1280  
 Arg Val Leu Ser Ser Lys Ala Ser Gly Glu Pro Pro Leu Leu Leu Ala  
 1285 1290 1295  
 Ser Ser Val His Cys Ala Met Arg Glu Ala Ile Arg Ala Ala Arg Lys  
 1300 1305 1310  
 Glu Phe Ser Val Cys Thr Gly Pro Ala Asn Ser Ala Ile Thr Phe Gln  
 1315 1320 1325  
 Met Asp Val Pro Ala Thr Met Pro Val Val Lys Glu Leu Cys Gly Leu  
 1330 1335 1340  
 Asp Val Val Glu Arg Tyr Leu Glu Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Thr  
 1345  
 Asn Thr Ala Lys Ala

【0071】

配列番号：4

配列の長さ：4,359

配列の形：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の起源：

生物名：トウモロコシ (Zea mays L.)

株名：品種 ゴールデンドロクロバンタム70

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：91..4138 (終始コドンを含む)

特徴を決定した方法：E

配列

CCG GCT CTC TCG GTG CAG ACG TCC GGG ACT AGT ACG TGG ATC GGG CCG	48
GGG GCA ACT CGA GTC GTC AAG AAG GCT GCT ACC TGC TAG AGG ATG GAG	96
ATG GGG AAG GCG GCG GCG GTG GTG CTG GCG GTG AAC GGC AAG CGG TAC	144
GAG GCC GCC GGC GTG GAC CCG TCG ACG ACG CTG CTG GAG TTC CTG CGC	192
ACC CAC ACG CCC GTC AGG GGG CCC AAG CTC GGC TGC GGC GAA GGT GGC	240
TGC GGT GCA TGC GTT GTG CTT GTC TCG AAG TAC GAC CCA GCC ACC GAC	288
GAG GTG ACC GAG TTC TCA GCG AGC TCC TGC CTG ACG CTG CTC CAT AGC	336
GTG GAC CGC TGC TCG GTG ACC ACC AGC GAG GGC ATT GGC AAC ACC AAG	384
GAT GGC TAC CAC CCT GTG CAG CAG CGC CTC TCC GGC TTC CAC GCC TCC	432
CAG TGC GGT TTC TGC ACG CCC GGC ATG TGC ATG TCC ATC TTC TCT GCG	480
CTT GTC AAA GCC GAC AAG GCG GCC AAC CGG CCA GCC CCA CCG GCC GGC	528
TTC TCC AAG CTC ACT TCC TCG GAG GCT GAG AAG GCT GTC TCT GGC AAC	576
CTG TGC CGC TGC ACA GGG TAC AGG CCC ATC GTC GAC GCC TGT AAG AGC	624
TTC GCA GCC GAT GTT GAT CTT GAG GAC CTG GGC CTC AAC TGC TTC TGG	672

AAG AAG GGT GAT GAG CCT GCA GAT GTC AGC AAG CTG CCA GGC TAC AAC	720
AGT GGT GAC GTC TGC ACT TTC CCT GAC TTT CTC AAA TCT GAG ATG AAG	768
TCC TCA ATT CAG CAG GCT AAC AGC GCT CCA GTT CCT GTT TCT GAC GAC	816
GGC TGG TAC CGT CCT AGG AGC ATT GAC GAG CTT CAC AGG TTG TTT CAA	864
TCT AGC TCC TTC GAT GAA AAT TCC GTG AAG ATA GTG GCT TCA AAC ACT	912
GGG TCT GGA GTG TAC AAG GAT CAG GAC CTT TAT GAC AAG TAC ATT GAC	960
ATC AAA GGA ATC CCA GAG CTT TCA GTC ATC AAC AGA AAC GAC AAA GGA	1008
ATT GAG CTT GGA TCA GTT GTG TCC ATC TCT AAA GCT ATT GAG GTG CTG	1056
TCA GAT GGA AAT CTC GTC TTC AGA AAG ATT GCT GGT CAC CTG AAC AAA	1104
GTG GCT TCA CCG TTT GTT CGG AAC ACT GCA ACC ATA GGT GGA AAC ATA	1152
GTC ATG GCA CAA AGA TTG CCA TTC GCA TCG GAC ATT GCA ACC ATA CTA	1200
CTA GCT GCA GGT TCA ACA GTC ACA ATC CAG GTG GCT TCC AAA AGG CTG	1248
TGC TTC ACT CTG GAG GAG TTC TTG CAG CAG CCT CCA TGC GAT TCT AGG	1296
ACC CTG CTG CTG AGC ATA TTT ATC CCG GAA TGG GGC TCA AAT GAT GTC	1344
ACC TTT GAG ACT TTC CGA GCA GCA CCT CGT CCA CTT GGC AAT GCT GTC	1392
TCA TAT GTC AAT TCA GCT TTC TTG GCA AGG ACT TCA TTG GAT GCA GCA	1440
TCA AAG GAC CAT CTC ATC GAG GAT ATA TGT CTG GCG TTC GGT GCT TAT	1488
GGA GCT GAT CAT GCT ATT AGA GCT AGA AAG GTT GAG GAT TAC CTG AAG	1536
GGC AAA ACA GTG AGC TCG TCT GTC ATA CTT GAA GCT GTT CGG TTG CTT	1584
AAA GGG TCT ATT AAA CCA TCA GAA GGC TCA ACA CAT CCT GAG TAT AGA	1632
ATT AGC TTG GCT GTC AGT TTC TTG TTT ACC TTC CTA TCC TCC CTT GCC	1680
AAC AGC TTG AAT GAA TCT GCA AAG GTT AGT GGT ACC AAC GAG CAC TCA	1728
CCA GAG AAG CAA CTC AAG TTG GAC ATC AAT GAT TTG CCA ATA CGA TCA	1776
AGA CAA GAA ATA TTT TTC ACT GAT GCA TAT AAG CCA GTT GGC AAA GCA	1824
ATT AAG AAA GCT GGG GTA GAG ATC CAA GCT TCA GGG GAA GCT GTG TAC	1872
GTT GAT GAT ATC CCT GCT CCC AAA GAT TGC CTC TAT GGG GCA TTT ATT	1920
TAT AGC ACA CAC CCT CAT GCA CAT GTA AAG TCA ATC AAC TTT AAA CCA	1968
TCT TTG GCT TCA CAG AAG ATC ATC ACA GTT ATC ACT GCA AAG GAT ATT	2016
CCC AGC GGT GGA CAA AAT GTT GGT TAT AGC TTC CCG ATG ATT GGA GAA	2064

GAA GCA CTT TTT GCA GAT CCA GTT GCT GAA TTT GCT GGT CAA AAT ATT 2112  
GGT GTC GTG ATT GCT CAA ACA CAG AAG TAT GCC TAC ATG GCG GCA AAG 2160  
CAA GCC ATC ATT GAG TAT AGC ACA GAA AAT CTG CAG CCA CCA ATT CTG 2208  
ACA ATA GAA GAT GCA ATT GAA CGA AGC AGC TTC TTC CAA ACC CTC CCA 2256  
TTT GTA GCT CCT AAG CCA GTT GGT GAT TAC GAC AAA GGG ATG TCT GAA 2304  
GCT GAT CAC AAG ATT TTA TCG GCA GAG GTA AAA ATT GAA TCC CAA TAC 2352  
TTT TTC TAC ATG GAG CCA CAA GTG GCG CTA GCT ATT CCT GAT GAA GAT 2400  
AAC TGC ATA ACC ATC TAT TTT TCG ACA CAA TTA CCT GAG TCC ACA CAA 2448  
AAT GTG GTT GCA AAG TGC GTT GGC ATT CCA TTT CAC AAT GTC CGT GTA 2496  
ATC ACC AGA AGG GTC GGA GGA GGC TTT GGT GGA AAA GCA TTG AAA TCA 2544  
ATG CAT GTT GCA TGT GCA TGT GCA GTT GCT GCA TTG AAG CTA CAA CGT 2592  
CCA GTT CGG ATG TAC CTC GAT CGC AAG ACA GAC ATG ATA ATG GCA GGC 2640  
GGG CGG CAT CCT ATG AAG GTG AAG TAC TCT GTT GGG TTC AAG TCA AAC 2688  
GGC AAG ATC ACA GCC TTA CAT CTT GAT CTT GGG ATC AAT GGT GGA ATA 2736  
TCT CCA GAT ATG AGT CCA ATG ATT GCA GCA CCT GTC ATA GGT TCT CTC 2784  
AAA AAG TAC AAC TGG GGC AAT CTT GCA TTT GAC ACC AAG GTC TGC AAA 2832  
ACA AAT GTC TCA TCA AAA TCG TCA ATG AGA GCT CCT GGA GAT GCG CAG 2880  
GGC TCT TTC ATT GCT GAA GCC ATC ATC GAG CAT GTT GCC TCG GCA CTT 2928  
TCA GCC GAC ACT AAT ACC ATA AGG AGA AAG AAC CTT CAT GAC TTT GAG 2976  
AGC CTT GCA GTG TTC TTT GGA GAT AGT GCA GGT GAA GCT TCT ACA TAC 3024  
AGC CTT GTC ACC ATG TTC GAT AAA TTG GCC TCC TCT CCA GAA TAC CAG 3072  
CAC CGA GCT GAA ATG GTG GAA CAA TTC AAC CGA AGC AAC AAG TGG AAG 3120  
AAG CGT GGC ATT TCT TGT GTG CCT GTA ACA TAT GAG GTG CAG CTT CGG 3168  
CCA ACT CCA GGA AAG GTG TCT ATC ATG AAT GAT GGT TCC ATT GCT GTT 3216  
GAG GTT GGA GGG GTT GAG CTA GGC CAA GGG TTG TGG ACA AAA GTG AAG 3264  
CAG ATG ACG GCA TTC GGA CTA GGA CAG CTG TGT CCT GGC GGC GGT GAA 3312  
AGC CTT CTA GAC AAG GTG CGG GTC ATC CAG GCC GAC ACA TTG AGC ATG 3360  
ATC CAA GGA GGG GTC ACT GGT GGG AGC ACC ACT TCT GAA ACT AGC TGT 3408  
GAA GCA GTT CGT AAG TCG TGT GTT GCA CTC GTC GAG AGC TTG AAG CCA 3456

ATC AAG GAG AAT CTG GAG GCT AAA ACT GGC ACA GTG GAA TGG AGT GCC	3504
TTG ATT GCA CAG GCA AGT ATG GCG AGC GTT AAC TTA TCG GCA CAT GCA	3552
TAC TGG ACC CCT GAT CCA ACT TTC ACA AGC TAT TTG AAC TAC GGA GCC	3600
GGC ACT AGC GAG GTG GAA ATT GAT GTC CTG ACA GGA GCA ACA ACA ATT	3648
CTA AGG AGT GAC CTT GTC TAC GAT TGC GGG CAA AGC TTG AAC CCT GCT	3696
GTC GAT TTG GGG CAG GTG GAA GGT GCA TTC GTA CAA GGA GTA GGC TTC	3744
TTC ACA AAC GAG GAG TAC GCA ACC AAC TCT GAC GGG TTG GTC ATC CAC	3792
GAT GGC ACA TGG ACG TAC AAG ATC CCC ACG GTC GAC ACC ATC CCA AAG	3840
CAG TTC AAC GTT GAG CTG ATC AAC AGC GCC CGT GAC CAG AAG CGC GTC	3888
CTC TCT TCC AAA GCA TCG GGC GAG CCT CCG CTT CTC CTA GCT TCC TCT	3936
GTG CAC TGC GCA ATG AGG GAG GCC ATC AGG GCC GCC AGG AAA GAA TTC	3984
TCG GTC TGC ACT GGT CCA GCG AAC TCC GCC ATC ACG TTC CAG ATG GAC	4032
GTG CCG GCA ACG ATG CCT GTC GTC AAG GAG CTC TGC GGC CTG GAT GTC	4080
GTT GAG AGG TAC CTG GAG AGC GTG TCG GCT GCC AGC CCA ACA AAC ACC	4128
GCT AAA GCA TAG ATC CAG TAG GCG CTC TAT CCA TGG TGT GAT GGC TTA	4176
ATC AAT CTG TAA AAC ACT AAG CGG CGT GAC ATG CCG AGC TTT CAG TGT	4224
TAG CTA TGA TGT ACA GAA GAA GAG GTA CCA ATG GCG AGT TGT GGC CAT	4272
GCG AAT CAG GAG TCA TGA ACC ATT GAG GGG GGA AAT AAA GTA AAT AAG	4320
TGT TGC GCC GGC GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	4359

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

植物の IAA 生合成経路の解明、植物の育種に適する IAA 生合成酵素タンパク質遺伝子の探索が強く望まれている。

【解決手段】

植物から得られうる約4.4 k b p の遺伝子であり、アルデヒド化合物を酸化してカルボン酸を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードすることを特徴とするアルデヒドオキシダーゼ遺伝子及びその利用。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

596154398

【住所又は居所】

東京都八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学  
理学部生物学科内

【氏名又は名称】

小柴 共一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596154398]

1. 変更年月日 1996年10月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学理学部生物  
学科内

氏 名 小柴 共一